Aus dem Hygienischen Institut der Universität München
Direktor: Geh. Rat Prof. Dr. Kißkalt

Untersuchungen über Morphologie und Filtrierbarkeit der Bakterien der Typhusgruppe

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und einer

Hohen medizinischen Fakultät der Bayerischen Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Walter Hepp

München 1939
Universitäts-Buchdruckerei von Dr. C. Wolf & Sohn

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Referent:
Dozent Dr. med. et phil. *W. Schmidt-Lange*

Tag der mündlichen Prüfung:
16. 12. 1938

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen Eltern

in Dankbarkeit

gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548311_0193

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag bilden zur Frage nach der Existenz eines filtrierbaren Virus bei den Bakterien der Typhusgruppe.

Das über dieses Problem vorliegende Schrifttum ist sehr uneinheitlich. Während einige Untersucher auf Grund ihrer Versuche das Vorhandensein eines solchen Virus bejahen zu müssen glauben, ist es vielen anderen nie gelungen, das Virus nachzuweisen.

Sehr verschieden sind auch die angewandten Untersuchungsmethoden. In den meisten Fällen wird ein durch irgendwelche Zusätze veränderter Nährboden verwendet, auf dem sich die Virusform besonders gut entwickeln soll. Die Hauptrolle spielt hier ein Zusatz von Lithiumchlorid oder Kristallviolett zu dem Agarnährboden. Vor allem *Kuhn* und *Sternberg, Richter* und viele andere arbeiteten damit. *Almquist* behauptet, daß Algenschlamm ein besonders gutes Substrat für die Virusform darstelle. *Kendall, Breinl* und *Hoder* verwendeten peptonfreie Nährböden, während *Cantani* aus Milchkulturen das filtrierbare Virus isoliert haben will. Andere Untersucher, vor allem *Hauduroy,* erreichten durch Zusatz eines Bakteriophagen zu den Kulturen die Entwicklung des Virus. *Sanarelli* und *Alessandrini* nehmen an, daß in Typhuskulturen das Virus a priori vorhanden ist, bzw. sich im Körper des Versuchstieres entwickelt und verwenden überhaupt keine besonderen Nährböden.

Die Isolierung und Weiterzüchtung des Virus ist grundsätzlich auf zweierlei Art möglich. Entweder man filtriert die Kultur oder den Organbrei eines an Typhus verendeten Tieres durch bakteriendichte Filter und bringt das so gewonnene Filtrat auf für die betreffenden Bakterien besonders gut geeignete Nährböden oder verimpft es auf Versuchstiere. Oder man geht den zweiten Weg, indem man die Kulturen in Kollodiumsäckchen bringt, diese verschließt und einem Versuchstier in die Bauchhöhle implantiert oder in ein entsprechendes Nährmedium hängt. Man geht hier von der Vorstellung aus, daß das Virus sozusagen durch das Säckchen hindurch-

wächst und sich dann daraus wieder die Stäbchenform entwickelt. Mit der letzteren Methode haben besonders *Sanarelli* und *Alessandrini* positive Erfolge erzielt, die jedoch mit übersandten Säckchen im Institut Pasteur in Paris, nach einer mündlichen Mitteilung *van Deinses,* nicht bestätigt werden konnten.

Es ist ohne weiteres klar, daß bei beiden Methoden die Beschaffenheit der Filter bzw. Säckchen von ausschlaggebender Bedeutung ist. Denn nur, wenn diese einwandfrei und absolut undurchgängig für Bakterien sind, kann man den positiven Ausfall eines Versuches dem Vorhandensein des Virus zuschreiben. — In fast allen Fällen wurden bisher zur Filtration Chamberland- oder Berkefeld-Kerzen verwendet und mit Über- oder Unterdruck gearbeitet. Untersuchungen über die Beschaffenheit dieser Kerzen von *Hennyey* und anderen haben ergeben, daß die Porengröße in sehr weiten Grenzen schwankt und das Durchdringungsvermögen für die Bakterien stark von ihrer elektrischen Ladung abhängig ist. Sicher kann man die 0,75 cm und noch stärkere Wand der Kerzen nicht als einheitlich in ihrem Aufbau ansehen. Und es ist vollkommen unkontrollierbar, welchen Einwirkungen die Bakterien während der Passage durch diese Wand ausgesetzt sind. Von einer reinen Siebwirkung kann auf jeden Fall nicht die Rede sein und das wäre bei diesen Versuchen doch das idealste.

Eigene Versuche haben ergeben, daß z. B. Coli-Bakterien in verhältnismäßig kurzer Zeit durch Chamberlandkerzen hindurchwachsen. Die Versuchsanordnung war dabei folgende: Vorher sterilisierte Chamberlandkerzen wurden mit einer Brühekultur von Bacterium coli beschickt und keimdicht verschlossen. Diese Kerzen wurden in Kolben mit steriler Brühe gehängt, ebenfalls keimdicht abgeschlossen und die ganze Anordnung in den Brutschrank mit 37° C gebracht. Die Coli-Bakterien hatten die Chamberlandkerze L 1 nach 19 Stunden, L 5 nach 92 Stunden, L 7 nach 116 Stunden durchwachsen. Paratyphus B- und Proteusbakterien durchwanderten selbst die Kerze L 13 mitunter in wenigen Stunden. Man könnte einwenden, daß lediglich das Virus durchgewandert sei und sich daraus in der die Kerzen umgebenden Brühe Stäbchen entwickelt hätten, die die Brühe

trübten. Dann müßte das Virus schon zu einer Zeit vorhanden gewesen sein, als die Brühe noch nicht getrübt war. Aber Ausstriche oder Überimpfungen in sterile Brühe vor der Trübung hatten stets ein negatives Ergebnis.

Es ist also anzunehmen, daß die Stäbchen selbst ohne den bei den Filtrationen im allgemeinen herrschenden Druck oder Unterdruck in verhältnismäßig kurzer Zeit selbst noch sehr dichte Tonkerzen aktiv durchwandern. Zieht man in Betracht, daß die Stäbchen von Bacterium coli noch ziemlich plump sind im Vergleich mit den übrigen Bakterien der Typhusgruppe, so erhellt daraus, daß auch Kerzen wie Chamberland L 9 oder L 11 nicht als unbedingt bakteriendicht bezeichnet werden können, wenn auch sicher in der Mehrzahl der Fälle die Bakterien während der verhältnismäßig kurzen Dauer einer Filtration nicht mehr durchdringen werden. Versuche, die sich lediglich auf Filtrationen mit Tonkerzen stützen, sind also nicht als unbedingt beweisend anzusehen, zumal wenn, wie das in verschiedenen Fällen geschah, Kerzen mit relativ weiten Poren — L 2 oder L 3 — Verwendung fanden. Die Berkefeld-Kerzen, die nur in drei Abstufungen hinsichtlich der Porengröße geliefert werden, dürften für solche Versuche auch nicht geeignet sein. Die Filtration durch Agar ist überhaupt nicht in Betracht zu ziehen, da gerade die Bakterien der Typhusgruppe Agar verschiedenster Dichte ohne weiteres durchdringen (*Dimitrijevic* und *Hempt*).

Die andere Gruppe der Untersucher hat, wie bereits erwähnt, mit Kollodiumsäckchen gearbeitet. Diese Säckchen wurden meist mit der Kultur beschickt, verschlossen und in die Bauchhöhle von Versuchstieren implantiert. Wenn auch die Porengröße der Säckchen von dem Prozentgehalt des dabei verwendeten Kollodium und dem Anteil an Alkohol und Äther abhängig ist, so sind doch sicher die Poren im allgemeinen so klein, daß Bakterien sie unmöglich zu durchdringen vermögen. Jedoch jeder, der selbst solche Säckchen angefertigt hat, wird wissen, wie oft sie mißlingen und größere oder kleinere Löcher aufweisen oder schrumpfen und so unter Umständen undicht werden. Man müßte deshalb die Forderung erheben, nur Säckchen zu verwenden, die vorher mit einem Farbstoff oder einer

anderen Methode auf ihre Undurchlässigkeit geprüft werden. Anderseits ist es auch denkbar, daß das Säckchen in der Bauchhöhle des Versuchstieres beschädigt und dann für Bakterien durchgängig wird. Gerade, weil bei Nachprüfung von positiven Ergebnissen durch andere Untersucher oft völlig negative Resultate erzielt wurden, liegt die Vermutung nahe, daß oft irgendeine der vorgenannten Fehlerquellen das Ergebnis verfälschte.

Wer sich mit der Virusfrage beschäftigt, muß sich auch mit der Morphologie der Bakterien selbst beschäftigen.

Denn die meisten der angegebenen Spezialnährböden, die die Virusbildung anregen sollen, veranlassen an den Bakterien weitgehende Veränderungen hinsichtlich ihrer Gestalt.

An erster Stelle wären die Nährböden mit einem Lithiumchloridzusatz zu nennen. *Kuhn* und *Sternberg* beschreiben sehr ausführlich die auf diesen Nährböden wachsenden Formen und geben ihnen auch eigene Namen. Neben den Stäbchen sind vor allem Kokkenformen und größere Kugeln, die Vakuolen und teils auch Granula einschließen, zu sehen. Die obengenannten Verfasser sind soweit gegangen, die großen Kugelformen als eigene mit den Bakterien zusammenlebende Individuen, sogenannte Pettenkoferien zu bezeichnen. Diese Theorie ist allerdings unhaltbar; wir werden an anderer Stelle noch näher darauf eingehen. Auch *Richter* hat eindeutig nachweisen können, daß diese Formen aus den Stäbchen hervorgehen und sich auch wieder in solche zurückverwandeln können. Ebenfalls sehr oft verwendet wird ein Agar mit Kristallviolettzusatz. Auf diesem Nährboden entstehen lange Fadenformen mit unechten Verzweigungen. Diese Fäden sollen mehrmals unterteilt sein und ebenfalls Granula aufweisen.

Almquist beobachtete Kugelbildungen bei 10° auf Laktoseagar und bei 14° auf eingetrocknetem Agar. Die filtrierbare Form, glaubt er, entwickelt sich besonders gut in Algenschlamm. *Clauberg* sah besonders bei Kartoffelkältekulturen sog. Konidien und Kugeln auftreten. *Joukow* und *Früauf* berichten, daß durch Einwirkung des Bakteriophagen aus den Typhusstäbchen kokkenähnliche Ketten und schließ-

lich unregelmäßige Splitter entstehen. *Kritschewski* und *Rubinstein* sahen auf Raffinoseagar das Bacterium typhi die verschiedensten Formen annehmen. An weiteren Zusätzen wäre vielleicht noch Kaliumphosphat und Kartoffelmehl zu nennen.

Es ist natürlich, daß an diese verschiedenen Formen auch Hypothesen über einen Generationswechsel oder Entwicklungszyklus oder geschlechtliche Vermehrung geknüpft wurden. Man kann sich hier mit all diesen Theorien nicht auseinandersetzen, zumal sie doch meist auf sehr schwachen Füßen stehen. Doch sollen wenigstens einige erwähnt werden: *Uher* betrachtet die auf Lithiumchloridagar wachsenden Formen als zu einem Entwicklungszyklus gehörend. Er spricht von Knospung und geschlechtlicher Fortpflanzung. Die bei den Kugelformen auftretenden Granula betrachtet er als Kernsubstanz der Bakterien, gestützt darauf, daß diese eine positive Feulgen-Reaktion geben. *A.* und *G. Hollande* unterscheiden 6 Stadien im Entwicklungszyklus der Typhusbakterien. Sie haben festgestellt, daß sich in älteren Kulturen die Stäbchen auflösen. Vor dieser Auflösung bilden sich an jedem Ende des Stäbchens sog. Renitozyten. Diese bestehen aus einem Nukleosom, etwas Protoplasma und einer umhüllenden Membran. Diese Renitozyten sollen auch die filtrierbare Form des Typhusbazillus darstellen. Auch *Hausam* ordnet die verschiedenen Formen der Typhusbazillen in einen sog. Lebenszyklus ein.

Die wichtigste Frage ist, ob es sich bei diesen Formen um Entwicklungsstadien oder lediglich um Degenerations- und Involutionsformen handelt. Den eindeutigen Beweis nach der einen oder anderen Richtung konnte bis jetzt aber noch kein Untersucher erbringen.

Technik der Versuche.

Bei den eigenen Versuchen wurde, in Erkenntnis der Mängel und Fehlerquellen ein anderer Weg eingeschlagen. Es fanden nämlich bei der Filtration der Bakterienkulturen ausschließlich Membranfilter Verwendung. Bei diesen, von der Membranfiltergesellschaft Göttingen hergestellten Filtern handelt es sich um dünne Gallerten, deren Grundsubstanz aus Zelluloseestern bzw. Zellulose besteht. Im Gegensatz zur Adsorptionswirkung der Tonkerzen handelt es sich

hier um eine reine Siebwirkung. Während bei den adsorptiv wirkenden Filtern mit ihrem verhältnismäßig groben Hohlraumsystem die zu filtrierenden Teilchen nach Sättigung des Adsorbens das Filter passieren, wird bei den Membranfiltern jedes Teilchen, das größer ist als die weiteste Pore des Filters, absolut zurückgehalten.

Die Filter werden nach einem besonderen, von Professor *Manegold* ausgearbeiteten Verfahren auf ihre maximale Porengröße geeicht. So läßt sich je nach dem Ausfall der Filtration über die Größe der im Filtrans befindlichen Teilchen eine ziemlich genaue Angabe machen. Für die Filtrationen wurden drei verschiedene Apparate verwendet. Der von der Membranfiltergesellschaft Göttingen hergestellte Filtrierapparat Stefi 4, der von der gleichen Firma hergestellte Thiessenapparat und der von *P. Grabar* angegebene Filtrationsapparat. Am besten hat sich das letztere Modell bewährt. Denn durch den Schraubenverschluß ist eine besonders gute Abdichtung der beiden Teile des Apparates gegeneinander und nach außen gewährleistet. Diese Dichtung beim Stefi 4 zu erreichen, war oft nicht ganz einfach, zumal wenn der Apparat unter sterilen Kautelen auf- und abmontiert werden sollte. Der Thiessenapparat wurde in späteren Versuchen nicht mehr verwendet, da er für diese Zwecke als nicht sonderlich geeignet erschien.

Alle diese Apparate wurden gebraucht in Kombination mit dem von *Schmidt-Lange* angegebenen Apparat. Dieser gestattet bei fortlaufender Unterdruckfiltration einzelne Filtratportionen abzunehmen, ohne den Filtrationsakt unterbrechen zu müssen. Dadurch war es möglich, während der ganzen Filtration einerseits die Druckverhältnisse konstant zu erhalten, andererseits aber durch Entnehmen verschiedener Portionen Aussagen über die einzelnen Phasen der Filtration zu machen. Der Unterdruck wurde mit einer Wasserstrahlsaugpumpe bzw. Ölpumpe erzeugt und stets genau gemessen. Alle bei der Filtration Verwendung findenden Teile wurden natürlich vorher im Autoklaven sterilisiert. Da es sich herausstellte, daß die Membranfilter eine Sterilisation nicht aushalten, wurden sie in die Filtrierapparate erst nach der Sterilisation eingelegt. Die Filter selbst werden in 1%iger Formalinlösung aufbewahrt. 24 Stunden vor der

in Frage kommenden Filtration werden sie in steriles Aqua dest. überführt, das dann mehrmals gewechselt wird. Diese Maßnahmen garantieren, daß die verwendeten Filter steril, aber auch frei von Desinfektionslösung sind.

Die einzelne Filtration dauerte im allgemeinen nicht länger als eine halbe Stunde. In gleichen Zeitabständen wurden dabei bis zu sechs Filtratproben abgenommen. Diese Filtrate wurden dann bei 37° C bebrütet. Unbeschadet des Ergebnisses wurde von jeder Portion ein Ausstrich auf einen festen Nährboden gemacht und bei positivem Ausfall in den meisten Fällen durch Agglutination mit dem entsprechenden Serum eine Sekundärinfektion ausgeschlossen.

Filtriert wurden Brühekulturen und Suspensionen in Brühe von Kulturen der Bakterien Paratyphus B 222, Typhus 101, Breslau 157 und Gärtner 88 auf Lithiumchlorid- und Kristallviolettagar.

Der verwendete Lithiumchloridagar hatte folgende Zusammensetzung: 10 g Lab-lembco, 25 g Fadenagar, 3 g Natriumchlorid, 2 g Natriumphosphat und 10 g Pepton Witte auf 1000 ccm p_H 6,6. Auf 100 ccm dieses Agars werden 2,5 g Lithiumchlorid gegeben.

Kristallviolettagar: Der Agar hatte dieselbe Zusammensetzung, nur war das p_H 7,6. Zu 200 ccm dieses Agars wurden 3 Tropfen einer 2%igen Stammlösung von Kristallviolett gegeben.

Lithiumchloridbrühe: Der sonst verwendeten Nährbrühe wurden lediglich 2,5 g Lithiumchlorid auf 100 ccm zugesetzt.

Filtrationsversuche mit Bakterium paratyphi B Stamm 222.

In drei Filtrationsversuchen mit Filtern von einer Porenweite von 1 μ, 0,75 μ und 0,65 μ wurde festgestellt, daß die in gewöhnlicher Nährbrühe gewachsenen Stäbchen diese Filter nicht mehr durchdringen können. Dagegen zeigte sich, daß die auf Lithiumchloridagar gewachsenen Formen in wiederholten Versuchen Filter mit 0,65 μ Porenweite passierten. Allerdings sind Filter mit 0,3 μ Porenweite auch für diese Formen zu eng. Kulturen auf Kristallviolettagar verhielten sich ebenso. Daraus ist ersichtlich, daß auf den beiden Spezialnährböden kleinere Formen wachsen müssen, die vermehrungs-

fähig sind. Da nicht in allen Filtrationsphasen diese umgeformten Bakterien die Filter durchdrangen, ist es wahrscheinlich, daß es sich nur um einzelne Individuen handelte.

Filtrationsversuche mit Bakterium enteritidis Breslau Stamm 157.

Die Versuche mit gewöhnlichen Brühekulturen ergaben, daß Filter mit 0,5 μ und 0,65 μ Porenweite zu feinporig sind; erst das Filter mit 0,75 μ Porenweite wurde von den Stäbchen passiert. Die auf Lithiumchlorid- und Kristallviolettagar wachsenden Formen haben die Filter mit Poren von 0,5 μ Durchmesser noch durchdrungen, wie 3 Versuche zeigten. Engere Filter erwiesen sich auch hier als undurchlässig.

Filtrationsversuche mit Bakterium enteritidis Gärtner Stamm 88.

Die auf den gewöhnlichen Nährböden wachsenden Formen passieren noch Filter mit 0,75 μ und 0,65 μ Porenweite. Lediglich Individuen der Kulturen, die auf Kristallviolettagar gewachsen sind, passieren Poren von 0,5 μ Durchmesser. Züchtung auf Lithiumchloridagar ergibt offensichtlich keine kleineren Formen. Die Filter mit 0,3 μ maximaler Porenweite waren auch hier in allen Versuchen für sämtliche Formen zu eng.

Filtrationsversuche mit Bakterium typhi abdominalis Stamm 101.

Die in gewöhnlicher Nährbrühe und auf Lithiumchloridagar wachsenden Formen durchdringen Filter mit 0,65 μ maximaler Porenweite nicht mehr, im Gegensatz zu den auf Kristallviolettagar wachsenden Bakterien. Die engeren Filter erweisen sich für alle Formen als undurchlässig.

Man könnte bei diesen Versuchen einwenden, daß sich das Virus auf festen oder flüssigen Nährböden überhaupt nicht entwickeln kann, bezw. daß sich aus ihm keine Stäbchen bilden können. Es wird vielfach angenommen, daß die Entwicklung erst nach mehrfachen Passagen eintritt oder an das Vorhandensein lebender Zellen gebunden

ist. Die nachgenannten Tierversuche von anderen Autoren sind in der Mehrzahl aber auch negativ verlaufen. Es dürfte also diesem Einwand nicht allzuviel Bedeutung beizumessen sein.

Cantani filtrierte Milchkulturen durch Chamberlandkerzen. Er will beobachtet haben, wie sich auf den Agarkulturen aus dem Filtrat-Virus normale Typhusbazillen entwickelten. *Cuboni* filtrierte 24 Typhusstämme unter besonderer Berücksichtigung der von *Almquist* angegebenen Technik durch Berkefeld-N-Kerzen.

Er konnte in keinem Fall ein Virus nachweisen. — Auch *Giani* hatte bei seinen Versuchen immer ein negatives Ergebnis. Er spritzte Organfiltrate von an Typhus eingegangenen Tieren Meerschweinchen ein. Es entstand bei diesen Tieren weder das Krankheitsbild des Typhus abdominalis noch irgendein Zeichen von Immunität. — *Gildemeister* und *Herzberg*, die menschliches Typhusmaterial, das keine Bazillen enthielt, Meerschweinchen injizierten, beobachteten ebenfalls keine Bildung eines spezifischen Typhusantikörpers. — *Friedberger* und *Virgillo* glauben dagegen, nach ihren Versuchen ein filtrierbares Virus annehmen zu müssen. Letzterer stellte bei Meerschweinchen ein dem menschlichen Typhus ähnliches Krankheitsbild fest, ohne daß Typhusbazillen nachzuweisen waren. Auch bei passageweiser Übertragung der Organe auf andere Tiere konnte wieder dasselbe Krankheitsbild erzeugt werden. In der dritten Passage allerdings wurden nur mehr leichte Temperatursteigerungen und Auftreten von Agglutininen für Typhusbazillen festgestellt.

Filtrationsversuche mit Zusatz eines Bakteriophagen.

Hauduroy, Fejgin und andere, konnten durch Zugabe eines Bakteriophagen zu den Kulturen, die Entwicklung des filtrierbaren Virus erreichen. Diese Versuche wurden mit drei Stämmen von Typhusbakteriophagen nachgeprüft. Es fielen jedoch alle Filtrationsversuche in dieser Richtung negativ aus.

Zusammenfassung.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß es weder mit Kulturen auf Lithiumchlorid- oder Kristallviolettagar noch mit Zusatz

eines Bakteriophagen zu den Kulturen gelungen ist, die Entwicklung eines filtrierbaren Virus bei den untersuchten Bakterien der Typhusgruppe nachzuweisen. Auch bei den Brühe- oder Agarkulturen konnte niemals das Auftreten des Virus beobachtet werden. Es hat sich ganz eindeutig gezeigt, daß in dem Augenblick, in dem die Bakterien die Filter nicht mehr zu durchdringen vermögen, auch die aus dem Filtrat angelegten Kulturen kein Wachstum aufweisen. Würde man bei den Versuchen so vorgehen, daß man einfach feststellt, welches Filter die auf den üblichen Nährböden wachsenden Stäbchen nicht mehr passieren und dann eine auf Lithiumchloridagar gewachsene

Übersicht der Filtrationsversuche mit Membranfiltern.

Bakterienstamm	maximale Porenweite				
	0,3 μ	0,5 μ	0,65 μ	0,75 μ	1,0 μ
Bact. paratyphi B Stamm 222	1.		negativ	negativ	negativ
	2. negativ		positiv		
	2.		positiv		
	3.		positiv		
Bact. typhi Stamm 101	1.		negativ	positiv	
	2. negativ		negativ		
	2.		negativ		
	3. negativ		positiv		
	4. negativ	negativ	negativ		
Bact. Breslau Stamm 157	1.	negativ	negativ	positiv	
	2. negativ	positiv			
	2.	positiv			
	3. negativ	positiv			
Bact. Gärtner Stamm 88	1.	negativ	positiv	positiv	
	2. negativ	negativ			
	2.	negativ			
	3. negativ	positiv			

Zeichenerklärung: 1. = Kulturen auf gewöhnlichem 2,5 % Agar
2. = Kulturen auf 2,5 % Lithiumchloridagar
3. = Kulturen auf Kristallviolettagar
4. = Kulturen mit Bakteriophagenzusatz.

Kultur durch dieses Filter schicken, so würden sicher einige auf diesem Nährboden entstandene Bakterienformen das Filter durchdringen und sich in dem Filtrat vermehren. Dann würde es sehr naheliegen, den Schluß zu ziehen: Bakterien gehen, wie erwiesen, durch diese Filter nicht mehr, also kann es nur ein filtrierbares Virus gewesen sein, das das Filter passierte. Gerade die Versuche mit den so fein abgestuften, geeichten Membranfiltern (siehe Tabelle S. 14) haben aber erwiesen, daß dieser Schluß unberechtigt ist und auf den in Frage stehenden Nährböden lediglich etwas kleinere und anders gestaltete, vermehrungsfähige Formen entstehen.

Morphologische Studien.

1. An gefärbten Präparaten:

Zur Ergänzung der Filtrationsversuche ist es noch unerläßlich, sich mit der Morphologie, der auf den verschiedenen Nährböden wachsenden Bakterien, zu beschäftigen.

Bei mikroskopischer Untersuchung der auf Lithiumchloridagar wachsenden Kulturen ist man über die Formänderung der Bakterien erstaunt. Statt der Stäbchenformen sieht man Kugeln in den verschiedensten Größen. Es sind Formen von der Größe von Kokken mit homogenem Endoplasma zu finden, etwas größere Kugeln, ebenfalls noch mit einheitlichem Plasma; Kugeln mit einem Durchmesser von 3 bis 8 μ weisen im Innern gewöhnlich Vakuolen und teilweise auch granulaartige Verklumpungen des Endoplasmas auf. Wenn auch die runden Formen vorherrschen, so sind daneben auch Gebilde zu finden, die mit ihren Fortsätzen und der unregelmäßigen Gestalt amöboides Aussehen haben. Auch in ihrer Form noch unveränderte Stäbchen sind vorhanden. Es läßt sich nicht sagen, ob dies Leichen sind, oder gegen die Einwirkung von Lithiumchlorid resistente Formen.

Auch hat sich gezeigt, daß nicht bei allen untersuchten Stämmen die Bakterien die gleichen Formänderungen durchmachen. Bacterium Breslau zeigte mehr die großen Kugelformen mit Vakuolen und Granula. Bei einer 24 stündigen Kultur von Bact. Breslau z. B. schwankte der Durchmesser der Kugeln zwischen 3,4 und 8,5 μ.

Bacterium typhi wies Kugeln mittlerer Größe mit homogenem Endoplasma auf, während bei Bact. Paratyphus B mehr neben den großen Kugeln die Kokkenformen vorherrschten. Bei Bact. Breslau und Para B findet man daneben immer granulaartige Gebilde, die noch kleiner als Kokken sind. Bei Bact. Gärtner waren Kugelformen nur selten zu finden, das Bild beherrschten aufgequollene Stäbchen, die in der Mitte eine Vakuole zeigen. Bei den älteren Kulturen verschwinden allmählich die großen Formen und es sind in der Hauptsache noch Formen in der Größe von Kokken und etwas größer zu finden. Bei 5 bis 8 Tage alten Kulturen tauchen sogar wieder Stäbchen in größerer Anzahl auf und es möchte fast scheinen, als ob dies ein Zeichen dafür sei, daß sich die Bakterien an den Nährboden gewöhnen.

Selbstverständlich gelingt es, die Kulturen von Nährboden zu Nährboden zu übertragen, ohne daß eine Strukturänderung der Bakterien eintritt. Dies mag als Beweis dafür gelten, daß diese Formen vermehrungsfähig sind. Bei 37° geht das Wachstum etwas rascher vonstatten als bei 22°. Überträgt man die Kulturen wieder auf einen der gewöhnlichen Nährböden, so entwickeln sich wieder Stäbchen und nur Stäbchen; die anderen Formen konnten nie beobachtet werden. Ein Beweis dafür, daß es sich bei den anderen Formen lediglich um eine Reaktion der Bakterien auf das Lithiumchlorid handelt und auch dafür, daß diese Kugelformen tatsächlich Abkömmlinge der Stäbchen sind. Denn würde es sich, wie *Kuhn* und *Sternberg* glauben, um eigene Lebewesen handeln, so ist doch nicht einzusehen, wie diese binnen weniger Stunden wieder vollkommen verschwinden.

Ein anderes Bild boten die Kulturen auf Kristallviolettagar. Neben unveränderten Stäbchen waren hier lange Fadenformen zu sehen. Diese Fäden waren 5,1 bis 25,5 μ lang und zeigten Einschnürungen und manchmal im Innern auch ganz feine Granula. Auch hier waren Passagen ohne weiteres möglich und bei Übertragung auf die gewöhnlichen Nährböden wuchsen ausschließlich Stäbchenformen. Der Durchmesser der Fäden war in vielen Fällen erheblich geringer als der der Stäbchen.

2. Bei Lebendbeobachtung:

Genauen Einblick in die während der Umwandlung der Bakterien stattfindenden Vorgänge erhält man nur durch Lebendbeobachtung.

Zu diesem Zweck wurde ein Thermostat, der das Mikroskop einschließt, benützt, dabei aber dauernde Beobachtung zuläßt. Das optische System des Mikroskops bestand aus einem Zeiß-Apochromat 60 mal und einem Kompensationsokular 15 mal. Die der Beobachtung dienenden Kulturen wurden folgendermaßen hergestellt: Ein vorher sterilisiertes Deckglas wird auf flüssig gemachten Lithiumchloridagar aufgeklatscht und dann getrocknet. Diese hauchdünne Nährbodenschicht wird mit einer feinen Nadel beimpft und mit der Schichtseite nach unten wird das Deckglas auf einen Hohlschliffobjektträger gelegt. Mit Vaseline wird das Deckglas umrandet und so die Kultur luftdicht abgeschlossen. Am besten beimpft man den Nährboden mit einer etwa 12stündigen Brühekultur. Dadurch werden verhältnismäßig wenige Bakterien übertragen und sie liegen nicht zu dicht beieinander. Man stellt eine Stelle ein, wo nur einige wenige Bakterien liegen und kann dann die weitere Entwicklung gut verfolgen. Da es sich um einen festen Nährboden handelt, ist, wenn die Nährbodenschicht genügend getrocknet wurde, nicht mit größeren Ortsbewegungen zu rechnen.

In dieser Weise wurden die Stäbchen von Bact. Breslau beobachtet. In den ersten 5 Stunden ist nichts besonderes wahrzunehmen. Es teilen sich nur einige Bakterien durch Einschnürung in der Längsachse. Nach 5—6 Stunden findet man an den Polen der Stäbchen und bei manchen auch noch in der Mitte leichte Verdichtungen des Endoplasmas, die immer mehr zunehmen und nach 14—15 Stunden als fest umschriebene Körnchen wahrzunehmen sind. Die Stäbchen haben 2,3, manche sogar 4 solcher Körnchen. In den nächsten Stunden quillt das Stäbchen um so ein Körnchen herum auf, meist um das mittlere, aber auch um ein oder beide polständigen Körnchen. Das Körnchen zerfällt dabei in einzelne Schollen. Diese Quellung nimmt immer mehr zu, unter weiterem scholligen Zerfall der Körnchen. Das oder die übrigen Körnchen hängen schließlich nur mehr mit feinen Plasmabrücken an der so entstandenen Kugel und werden

im weiteren Verlauf ganz abgestoßen, wenn sie nicht mit in die entstehende Kugel einbezogen werden.

Dieses Stadium erreichen manche Bakterien schon nach 10 Stunden, im allgemeinen aber erst nach 20—24 Stunden. Eine weitere Umbildung der kleinen abgestoßenen Körnchen wurde nicht beobachtet. Manche Kugeln dagegen werden noch größer. Die Schollen, die anfangs nur an einigen Stellen der Kugel lagen, verteilen sich immer mehr, so daß schließlich die ganze Kugel einheitlich ausgefüllt ist. Jetzt teilen sich manche Bakterien durch Einschnürung in der Mitte. Viele der großen Kugeln gehen im Verlauf von weiteren 12 Stunden zugrunde. Dabei werden die Granula immer feiner und blasser, auch die Hülle wird undeutlicher und allmählich verschwinden die Konturen vollkommen.

Das Hauptaugenmerk gilt den abgestoßenen Körnchen, denn diese sind in ihrem Durchmesser kleiner als die Stäbchen, von denen sie ausgingen; sie haben sicher wie die anderen Körnchen, aus denen Kugeln wurden, die Potenz, Stäbchen und Kugeln zu bilden.

Es wird deshalb angenommen, daß diese Körnchen, kleiner als die Stäbchen, als die Formen angesprochen werden müssen, die die feinporigen Filter noch zu durchdringen vermögen, wenn es den Stäbchen nicht mehr möglich ist. Dieses Körnchen stellt kein Ultravirus dar, sondern ist ein bei der Teilung eines Stäbchens entstandenes, vermehrungsfähiges Bakterium, das auf gewöhnlichen Nährböden wieder seine Normalform annimmt, also ein sog. Splitter *(Spengler, Schmidt-Lange)*.

Bei den untersuchten Stämmen von Bact. Gärtner und Typhus waren offenbar solche Körnchenformen nicht vorhanden. Das stimmt gut mit den Beobachtungen überein. Denn bei Bact. Gärtner quollen lediglich die Stäbchen auf und zeigten in der Mitte eine Vakuole. Kugelformen waren äußerst selten, Körnchen nie zu sehen. Bei Bact. typhi waren wohl Kugeln mittlerer Größe mit homogenem Endoplasma vorhanden, nicht aber die Formen wie bei Bact. Breslau und Paratyphus B.

Die Beobachtung der Bakterien auf Kristallviolettagar ergab, daß

die Stäbchen nach etwa 5—8 Stunden zu langen Fäden auswachsen, die bis zu 25 μ lang sind und sich lebhaft wie Schlangen bewegen. Die Fäden zeigen 3—5 Einschnürungen und manchmal auch im Innern ganz feine Granula. Diese Granula, welche noch kleiner als die bei den Kulturen auf Lithiumchloridagar beobachteten sind, dürften auch hier die Formen darstellen, welche die feinporigen Filter noch passiert haben und sich dann in dem Filtrat vermehrten.

Ähnliche Beobachtungen machte *Löhnis* bei verschiedenen apathogenen Bakterien. Er beschreibt, daß sich in den Bakterienzellen 1—4 Gonidien entwickeln. Diese dürften mit den als Granula beschriebenen Körpern identisch sein. Auch stimmt mit den Beobachtungen überein, daß diese sog. Gonidien teilweise feinporigere Filter noch passieren können. Die von *Löhnis* als Gonidangien beschriebenen kugel- bis birnenförmigen Zellformen konnten auch hier beobachtet werden. Als Regenerativkörper werden die kleinen Kugeln von der Größe von Mikrokokken angesprochen. Eine vegetative Vermehrung dieser Formen wurde bei Lebendbeobachtung ebenfalls festgestellt. Eine Konjunktion mit Brückenbildung dagegen wurde nie wahrgenommen. Auch die Enzystierung der Gonidangien zu Mikro- bzw. Makrozysten war in diesen Kulturen nie nachzuweisen. Eine Symplasmabildung war in älteren Kulturen bei Lebendbeobachtung festzustellen. Doch erscheint es fraglich, ob in diesem Symplasma wieder sog. Regenerativeinheiten auftreten können; die Ergebnisse der Filtrationsversuche sprechen auf jeden Fall dagegen. Auch eine Konjunktion der unveränderten Bakterien durch Brückenbildung, wie sie *Löhnis* beschreibt, konnte bei den eingehenden Lebendbeobachtungen nie festgestellt werden.

Interessant erscheinen in diesem Zusammenhang auch die jüngst nach Beendigung dieser Versuche von *E. Groh* veröffentlichten Beobachtungen bei den Diphtheriebazillen. Er beschreibt die Bildung von Körnchen im Innern der Bazillen. Diese Körnchen füllen den Bakterienleib allmählich aus, erweitern ihn, bis sie ihn endlich sprengen und dadurch frei werden. Durch Keimung und Längsstreckung entstehen aus diesen Formen wieder kurze Diphtheriestäbchen. — Diese Ergebnisse zeigen, daß die bei den Bakterien der

Typhusgruppe beobachteten Formveränderungen auch bei anderen Bakterien zu beobachten sind. Die überall beobachteten vermehrungsfähigen Kleinformen, mag man sie nun als Regenerativkörper, Körnchen, Granula oder Splitter bezeichnen, stellen aber sicher keine Formen dar, die man als Ultravirus ansprechen könnte.

Schlußsätze.

Zahlreiche Autoren haben bei Kulturen von Bakterien der Typhusgruppe auf Lithiumchlorid- oder Kristallviolettagar oder durch Zugabe eines Bakteriophagen zu den Kulturen geglaubt, die Entwicklung eines filtrierbaren Virus feststellen zu können. — Vorliegende Filtrationsversuche haben gezeigt, daß es wohl gelingt, auf den genannten beiden Nährböden Formen zu erzielen, die kleiner sind als die auf den gebräuchlichen Nährböden wachsende Stäbchenform. Dagegen konnte nicht der geringste Anhaltspunkt für die Existenz eines ultravisiblen, filtrierbaren Virus, eines sogenannten Ultravirus, gewonnen werden. Es ist nie gelungen, aus Filtraten, die durch Filter mit 0,3 μ maximaler Porenweite gegangen waren, Bakterien zu züchten. Auch bei den Kulturen, denen ein Bakteriophage zugesetzt war, konnte die Entstehung eines Virus nicht nachgewiesen werden.

Durch Lebendbeobachtung von Bact. Breslau und typhi konnten alle Stadien der Umgestaltung der Stäbchen festgestellt und auf Lithiumchlorid- und Kristallviolettagar kleine Körnchen als die Bakterienformen erkannt werden, die gelegentlich engporige Filter noch zu durchdringen vermögen.

Schließlich sei es mir gestattet Herrn Dozent Dr. med. et phil. *W. Schmidt-Lange* für die Überlassung der Arbeit, für die wertvollen Anregungen bei deren Ausarbeitung sowie für die Übernahme des Referates meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Literaturnachweis.

1. *Adelmann L.:* Zbl. Bakter. I. Orig. **88**, 401 (1922). — 2. *Almquist E.:* Z. Hyg. **83**, 1 (1917). — 3. *Angerer:* Arch. f. Hyg. **91**, 269 (1922). — 4. *Baerthlein K.:* Zbl. Bakter. I. Orig. **81**, 386 (1918). — 5. *Bernhardt G.:* Z. Hyg. **79**, 179 (1912). — 6. Derselbe: Z. Hyg. **71**, 229 (1912). — 7. *Boncinelli U.:* Sperimentale **87**, 353 (1933). — 8. *Breinl* u. *Hoder:* Zbl. Bakter. I. Orig. **96**, 1 (1925). — 9. *Cantani A.:* Giorn. Batter. **15**, 550 (1935). — 10. *Carpanno M.:* Zbl. Bakter. I. Orig. **70**, 42 (1913). — 11. *Clauberg K.:* Zbl. Bakter. I. Orig. **105**, 161 (1928). — 12. Derselbe: Zbl. Bakter. I. Orig. **113**, 517 (1929). — 13. *Cuboni E.:* Boll. Ist. sieroter. milan. **9**, 276 (1930). — 14. *Eisenberg Ph.:* Zbl. Bakter. I. Orig. **73**, 473 (1914). — 15. *Fejgin B.:* C. r. Soc. Biol. Paris **93**, 1528 (1925). — 16. *Fortner J.:* Naturwiss. **23**, 699 (1935). — 17. *Friedberger E.:* Z. Immun. Forschg. **53**, 339 (1927). — 18. *Gates F.:* J. Bacter. **10**, 47 (1925). — 19. *Giani P.:* Boll. Soc. internaz. Mikrobiol. Sez. ital. **1**, 53 (1929). — 20. Derselbe: Giorn. Batter. **4**, 345 (1929). — 21. *Gildemeister* u. *Herzberg:* Klin. Wschr. **1927**, II, 890. — 22. *Grabar P.:* C. r. Soc. Biol. Paris **116**, 71 (1934). — 23. *Groh E.:* Zbl. Bakter. I. Orig. **141**, 222 (1938). — 24. *Hauduroy P.:* Presse med. **2**, 924 (1930). — 25. Derselbe: C. r. Soc. Biol. Paris **95**, 288 (1926). — 26. Derselbe: Bull. Acad. Méd. Paris III, **104**, 18 (1930). — 27. *Hausam W.:* Zbl. Bakter. II, Orig. **82**, 103 (1930). — 28. *Hennyey E.:* Zbl. Bakter. I. Orig. **140**, 74 (1937). — 29. *Hoder F.:* Zbl. Bakter. I. Orig. **93**, 424 (1924). — 30. *Hofmann P.:* Zbl. Bakter. I. Orig. **140**, 78 (1937). — 31. *Hollande A.* et *Hollande G.:* C. r. Acad. Sci. Paris **192**, 1585 (1931). — 32. *Joukow* u. *Früauf:* Vestn. Mikrobiol. (russ.) **13**, 271 (1934). — 33. *Kendall* u. *Rife:* California Med. **35**, 409 (1931). — 34. *Klinkowström A.:* Ark. Bot. (schwed.) **23 A**, Nr. 12 (1931); **24 A**, Nr. 10 (1932). — 35. *Kritschewski* u. *Rubinstein:* Giorn. Batter. **17**, 433 (1936). — 36. *Kuhn* u. *Sternberg:* Zbl. Bakter. I. Orig. **121**, 103 (1931). — 37. *Löhnis:* Zbl. Bakter. II. Orig. **56**, 529 (1922). — 38. *Pfuhl E.:* Z. Hyg **40**, 555 (1902). — 39. *Richter K.:* Zbl. Bakter. II. Orig. **90**, 134 (1934). — 40. *Rimpau:* Münch. med. Wschr. **1931**, II. 2124. — 41. *Rutschowski* u. *Lintschewskaja:* Z. Mikrobiol. (russ.) **15**, 820 (1935). — 42. *Sanarelli e Alessandrini:* Ann. Igiene **43**, 621 (1933). — 43. Dieselben: C. r. Soc. Biol. Paris **112**, 134 (1933). — 44. *Seiffert G.:* Zbl. Bakter. I. Orig. **139**, 337 (1937) — 45. *Shimidsu K.:* Zbl. Bakter. I. Orig. **71**, 338 (1914). — 46. *Sobernheim G.:* Zbl. Bakter. I. Orig. **132**, 330 (1934). — 47. *Soda T.:* Trans-far-East. Assoc. Trop. Med. Hong-Kong. **1**, 97 (1935). — 48. *Schmid-Lange W.:* Z. Hyg. **112**, 95 (1931). — 49. Derselbe: Z. Hyg. **113**, 90 (1931). — 50. Derselbe: Arch. f. Hyg. **114**, 304 (1935). — 51. *Schmitz K.:* Zbl. Bakter. I. **83**, 210 (1919). — 52. *Speth* u. *Hempt:* Zbl. Bakter. I. Orig. **131**, 115 (1934). — 53. *Stuart Ch.:* J. Bacter. **9**, 581 (1924). — 54. *Trotzky I.:* Zbl. Bakter. I. Orig. **72**, 113 (1914). — 55. *Uher M.:* Bratislav. lek. Listy **283** (1936). — 56. *Virgillo S.:* Rinasc. med. **6**, 458 (1929). — 57. *Zapatero E.:* Ann. Igiene **44**, 849 (1934). — 58. *W. Schmidt-Lange* u. *W. Hepp:* Arch. f. Hyg. **121**, 209 (1939).

Lebenslauf

Am 2. Februar 1914 wurde ich zu Frankfurt a. M. geboren. Nach vierjährigem Besuch der Schiller-Volksschule in Würzburg trat ich in das dortige Realgymnasium ein. 1929 trat ich an das Gymnasium Landau (Pfalz) über und erhielt dort im März 1933 das Zeugnis der Reife. Im Mai 1933 begann ich sodann an der Universität München das Studium der Medizin und legte hier im Juni 1935 die ärztliche Vorprüfung ab. Von meinen klinischen Semestern verbrachte ich eines in Kiel, die übrigen ebenfalls in München und bestand hier am 15. Dezember 1938 die ärztliche Staatsprüfung.